

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Demyelinisierung von Axonen des ZNS ist ein Ereignis, das bei Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose eine wichtige Rolle spielt und zum Teil dramatische Folgen hat. Die Ursachen und Vorgänge der Demyelinisierung sind nicht endgültig geklärt. Es besteht daher Bedarf an einem geeigneten Tiermodell, in dem

- eine vergleichbare Situation (Läsion) experimentell erzeugt wird
- und in dem diese Läsion als Ausgangspunkt für Untersuchungen dient, die auf eine Remyelinisierung solcher Läsionen abzielen und damit Ansätze für eine Therapie der MS liefern.

In der vorliegenden Arbeit wird ein praktikables Demyelinisierungsmodell am Göttinger Miniaturschwein beschrieben. In ihm wurde gezeigt, daß mit 0,01% demyelinisierendem Lysophosphatidylcholin (LPC) durch einen stereotaktischen Eingriff Läsionen im Corpus callosum produziert werden können, in denen die Markscheiden der Axone zerstört, die Axone aber und vor allem die Oligodendrozyten (OL) weitgehend erhalten bleiben. Insbesondere die Erhaltung der OL als potentiell remyelinisierende Zellen des ZNS war von Bedeutung. Eine optimale Fixation des Gehirns für die Histologie wurde durch eine Perfusion der Tiere über die *A. carotis communis dexter/sinister* erreicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde *in vivo* die Auswirkung einer Superfusion der Läsionen mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF untersucht. Wesentliche Bedeutung kam dabei dem Vergleich mit dem Effekt einer analog durchgeführten Superfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung PBS (Kontrolle) zu.

Den Tieren wurden zunächst stereotaktisch zwei Läsionen mit 10 µl LPC im Corpus callosum gesetzt. Nach 10 Tagen wurde eine Alzet-Minipumpe mit einer Pumprate von 5 µl/h implantiert und über diese unilateral NGF (50 µg/ml) und simultan kontralateral PBS superfundiert. Die Pumpen wurden weitere 10 Tage dort belassen. Dann wurden die Tiere durch Perfusion über die rechte und linke *A. carotis communis* getötet und perfusionsfixiert.

Das Gewebe der Läsionen sowie der angrenzenden Areale wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Der Erhaltungszustand der Axone und OL sowie der Dichtegrad des Myelins waren die wichtigsten Kriterien der Beurteilung. Die histologische Präparation für die Lichtmikroskopie umfaßte:

- Färbung mit LFB-PAS und Versilberung nach Bielschowsky zur Darstellung von Myelin bzw. Axonen,
- immunozytochemische Reaktionen mit anti-MBP und anti-MOG zur Darstellung myelinspezifischer Proteine,
- in situ-Hybridisierung der mRNA von Proteolipidprotein (PLP), einem Oligodendrozyten-spezifischen Protein, zur Darstellung intakter OL.
- Ausgewählte Proben wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Durch eine Perfusion über die rechte und linke A. carotis communis gelang eine optimale Fixierung der Gehirne.
- Eine in Vorversuchen ermittelte 0,01% LPC-Lösung war geeignet, eine demyelinisierte Läsion im Corpus callosum des Göttinger Miniaturschweines zu erzeugen, in der Axone und Gliazellen weitgehend erhalten blieben.
- Die gewünschte Demyelinisierung trat 10 Tage nach Injektion der 0,01% LPC-Lösung ein und blieb bis 3 Wochen weitgehend frei von spontaner Remyelinisierung.
- Experimentell erzeugte demyelinisierte Läsionen im Corpus callosum des Göttinger Miniaturschweines wiesen nach Superfusion mit NGF eine im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Remyelinisierung auf.

## 7 SUMMARY

Gerlinde Rohde

### Effect of NGF on remyelination of experimentally demyelinated areas in the corpus callosum of the Goettingen miniature pig.

Demyelination of axons in the CNS is an important event in diseases like multiple sclerosis, which can produce fatal consequences. The underlying etiopathogenic processes still remain unclear as the therapeutic situation is unsatisfying. Hence, there is demand for an animal model

- where an equivalent situation (lesion) is experimentally produced
- and which allows to using these lesions for investigations with the aim of remyelination of those lesions in an attempt to develop a therapy for multiple sclerosis.

This study presents a model of CNS demyelination in the Goettingen miniature pig. Preliminary experiments revealed that a concentration of 0.01 % (w/v) L- $\alpha$ -lysolecithin (LPC) was sufficient to produce demyelinated areas. The risk of a possible destruction of axons and cells by the detergent was minimized by this concentration although damaged axons were still observed. A volume of 10  $\mu$ l LPC was injected on both sides of the corpus callosum. A stereotactic frame was used to place the lesion as precise as possible.

In the second part of the study the effect of a superfusion with nerve growth factor (NGF) was investigated. After 10 days p.o. two osmotic alzet mini-pumps with pump rates of 5  $\mu$ l/h were implanted. At this time, NGF (50  $\mu$ g/ml) was superfused on the one and simultaneously phosphate buffered saline (PBS) on the contralateral side as a control over a period of further 10 days. The animals were killed in anesthesia by perfusion of a fixative via the left and right arteria carotis communis.

The tissue of the lesions and the adjacent areas were examined by light and electron microscopy. The main criteria for the assessment of a lesion as being acceptable were the conservation of axons and oligodendrocytes and the presence or absence of myelin per area. For light microscopy, the preparation of the tissue involved:

- staining with LFB-PAS and Bielschowsky silverstaining for visualizing myelin and axons,
- immunocytochemically reactions with anti-MBP and anti-MOG to show myelin specific proteins,
- detection of intact oligodendrocytes by in situ hybridisation of proteolipidprotein (PLP)-mRNA, an oligodendrocyte-specific protein.
- Examination by electron microscopy was performed on a selection of specimens.

The following results were obtained:

- A perfusion of the fixative via left and right arteria carotis communis produced a good fixation of the brains.
- The lysolecithin concentration of 0.01% was suitable to produce a demyelinated lesion in the corpus callosum of Goettingen miniature pigs while axons and cells remained largely unaffected.
- The intended demyelination was present 10 days after the injection of lysolecithin and stayed free from spontanous remyelination after 3 weeks.
- Lysolecithin induced demyelinated lesions in the corpus callosum of the Goettingen miniature pig superfused with NGF showed an increased remyelination when compared with controls.